

En esta sección los trabajos presentados deberán reunir las siguientes condiciones:

1. Deberán estar escritos en castellano.
2. Preferentemente en Word.
3. No deberán superar preferentemente las 25 carillas de hoja tamaño A4, escritas en cuerpo de letra 12, a doble espacio.
4. El ordenamiento de los mismos deberá seguir la estructura clásica de:
 - a. Título.
 - b. Autores, centro al que pertenecen y correo electrónico de contacto.
 - c. Resumen en castellano y en inglés (excluyente) de no más de 200 palabras.
 - d. Palabras clave: no más de 5 (cinco).
 - e. Introducción.
 - f. Material y métodos.
 - g. Resultados.
 - h. Discusión.
5. Las abreviaturas deberán ser definidas al ser mencionadas por primera vez,

excepto aquellas aceptadas por convención (por ejemplo, FIV, ICSI, etc).

6. Tablas y cuadros: en blanco y negro, teniendo especial cuidado de ser bien referidos desde el texto.

7. Figuras: todas serán en blanco y negro.

8. Bibliografía: las citas se harán en el texto y se ordenarán en forma correlativa al final del trabajo por orden de aparición. Las citas de revistas deberán consignarse de la siguiente manera:

a) apellido completo e iniciales de los 3 primeros autores, sin puntos y separados por comas; si hubiera más, puede colocarse "et al"; b) título del trabajo; c) abreviatura del nombre de la revista (tal como figuran en el Index Medicus); y e) año, volumen, número de la revista (optativo), página inicial y final.

En todos los casos el envío de trabajos, comentarios y publicaciones deberá hacerse por correo electrónico a la dirección de la secretaría de SAMeR: info@samer.org.ar

Cadherina epitelial como biomarcador de espermatozoides humanos funcionales. Estudios realizados en muestras de semen fresco y previamente criopreservado de donantes y de pacientes en tratamiento por infertilidad

Mónica Hebe Vazquez-Levin,¹ María Florencia Veiga,¹ Clara Isabel Marín-Briggiler,¹ Alberto Valcarcel²

¹ Instituto de Biología y Medicinal Experimental (IBYME), Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) - Universidad de Buenos Aires. Vuelta de Obligado 2490. Buenos Aires, (C1428ADN). Argentina.

² Instituto de Ginecología y Fertilidad (IFER). Marcelo T. de Alvear 2259, Buenos Aires, (1122), Argentina.

Los estudios presentados en este manuscrito forman parte del trabajo "Caracterización de la expresión de cadherina epitelial en las gametas y su participación en fecundación", de los Dres Veiga MF, Marín-Briggiler CI, Valcarcel A, Raffo MF. y Vazquez-Levin MH, galardonado con el Primer Premio "Dr Pedro R Figueroa Casas" del XIV Congreso Argentino de Medicina Reproductiva 2011.

Reproducción 2013;28:28-40

Resumen

Las técnicas de reproducción asistida son procedimientos estándar para el tratamiento de la infertilidad, si bien, en algunos casos, los resultados aún son adversos. Las alteraciones en el hombre contribuyen a esta patología en hasta 50% de los casos. Para la

terapéutica se emplean espermatozoides del semen obtenidos en el momento del procedimiento, aunque para ciertos pacientes y para todos los donantes, se emplea semen previamente criopreservado que produce injurias en la gameta. El monitoreo del semen no incluye evaluación de componentes espermáticos estructurales y/o funcionales. Nuestro equipo de investigación ha presentado evidencias sobre la expresión de la molécula de adhesión cadherina epitelial (CadE) en espermatozoides y ovocitos humanos, y su rol en la fecundación. En este estudio se evaluó la expresión de CadE en espermatozoides de semen fresco*

Correspondencia: Mónica Hebe Vazquez-Levin
Instituto de Biología y Medicina Experimental. CONICET.
Vuelta de Obligado 2490, (C1428ADN).
Laboratorios B16 & B24. Buenos Aires, Argentina.
Tel: 54-11-4783-2869, Int 248 & 271. Fax: 54-11-4786-2564.
E-mail: mhvazl@gmail.com

y criopreservado de donantes y pacientes. Los estudios revelaron un menor porcentaje de espermatozoides inmunorreactivos para CadE en semen de donantes previamente criopreservado respecto del obtenido previo al congelamiento. Asimismo, se identificaron pacientes con porcentajes menores de espermatozoides inmunorreactivos para CadE, resultados que se asociaron a un desempeño alterado en procedimientos de FIV e ICSI. Los resultados obtenidos permiten proponer a CadE como biomarcador estructural y funcional del espermatozoide humano.

(*Marín-Briggiler/Veiga et al, *Molecular Human Reproduction*, 2008)

Palabras claves. Fecundación, espermatozoide, cadherina epitelial, criopreservación, infertilidad.

Summary

Assisted Reproductive Technologies (ART) have become standard procedures to treat infertility; however, in some cases, results are still disappointing. Male infertility has been reported to contribute to this pathology in up to 50% of the cases. Therapeutic approaches involve the use of spermatozoa recovered from ejaculates produced at the time of the procedure or, alternatively, cryopreserved spermatozoa from some patients and from all semen donors. Semen evaluation does not include assessment of structural and/or functional sperm proteins. Our research group has previously reported a thorough study on the expression of epithelial cadherin (Ecadherin) in spermatozoa and oocytes, and has shown evidence on its involvement in fertilization related events. In the present study, a lower percentage of Ecadherin-immunoreactive spermatozoa were found in frozen-thawed spermatozoa from donors when compared to an aliquot of the same sample prior to cryopreservation. In addition, a set of samples from subfertile patients were found to have decreased percentages of Ecadherin-immunoreactive spermatozoa, results that were associated to altered sperm performance in ART (IFV, ICSI) procedures. Altogether, results from these studies lead us to propose a putative role of Ecadherin as a structural and functional biomarker for the human spermatozoon. (*Marín-Briggiler/Veiga et al, *Molecular Human Reproduction*, 2008)*

Key words. Fertilization, spermatozoa, epithelial cadherin, cryopreservation, infertility.

Introducción

La infertilidad, definida como la incapacidad de concretar un embarazo luego de un tiempo definido (en general de un año) de mantener relaciones sexuales sin tomar medidas anticonceptivas, es una patología que afecta hasta un 13-15% de las parejas en edad reproductiva a nivel mundial.¹ Se ha estimado que hasta en un 30% de los casos, alteraciones en la fertilidad masculina son causales directas de las dificultades en la concepción y en hasta un 50% de los casos contribuyen, al menos en parte, a la imposibilidad de lograr el embarazo.

Las técnicas de reproducción asistida han contribuido de manera decisiva en el tratamiento de las parejas sin ahondar en las causales de la infertilidad. En la mayor parte de los tratamientos con estas tecnologías se emplean espermatozoides de muestras de semen obtenidas en el momento del procedimiento terapéutico (muestras frescas). Sin embargo, en ciertos casos, tales como aquellos en los que se presenta la imposibilidad de obtención de la muestra al momento de la aspiración folicular, en casos de una aspiración folicular no exitosa, o en pacientes oncológicos, también se emplea semen previamente criopreservado. Asimismo, en algunos procedimientos se usan muestras de semen de donantes fértiles, las cuales son previamente criopreservadas para cumplimentar los controles obligatorios previamente a su utilización. Si bien el semen previamente congelado tiene un gran valor en el manejo de las parejas en tratamiento por infertilidad y se utiliza ampliamente en los procedimientos terapéuticos, se ha demostrado que la calidad de los espermatozoides previamente congelados se ve afectada durante el procedimiento de criopreservación. Entre las crioinjurias identificadas, se han descripto la pérdida de integridad y fluidez de membrana, así como estrés oxidativo que produce peroxidación lipídica, fragmentación del ADN y modificaciones en el citoesqueleto espermático.²⁻⁶

Tanto en aquellos casos en los que se emplean eyaculados obtenidos en el momento del procedimiento, como en los que se usa semen previamente criopreservado, las muestras se someten a la evaluación de los parámetros de rutina del semen (volumen seminal, así como concentración, motilidad y, en ciertos casos, morfología espermáticas). Dichos estudios no incluyen el análisis

de marcadores de funcionalidad espermática, en particular aquellos relacionados con la capacidad del espermatozoide de reconocer las envolturas del ovocito, ni permiten monitorear la integridad de la membrana plasmática en los espermatozoides previamente criopreservados.

La identificación de biomarcadores moleculares espermáticos asociados a las características funcionales de la gameta masculina y a su integridad estructural contribuirá a un mejor conocimiento del proceso de fecundación; asimismo, permitirá ofrecer alternativas para el diagnóstico y tratamiento de alteraciones en la capacidad fecundante del espermatozoide y será de gran utilidad en el manejo de las muestras de semen procesadas como parte del tratamiento de la pareja infértil. Al respecto, nuestro grupo de investigación ha desarrollado una serie de proyectos enfocados a la identificación de proteínas presentes en las gametas, asociadas a su funcionalidad. En años recientes, hemos completado un conjunto de estudios orientados a la caracterización de la expresión de la molécula de adhesión celular cadherina epitelial (CadE) en el tracto reproductor masculino y en ambas gametas. CadE es el miembro fundador de la superfamilia de cadherinas, glicoproteínas de membrana que median la adhesión intercelular homofílica (cadherina del mismo tipo) de manera dependiente de iones calcio.^{7,8} Como parte de estos estudios, describimos la localización específica de CadE en ovocitos humanos y en espermatozoides no capacitados, capacitados y reaccionados. Asimismo, presentamos evidencias de la participación de la CadE espermática en eventos de interacción espermatozoide-ovocito, a través de la demostración de la capacidad de anticuerpos bloqueantes de CadE de inhibir la interacción entre las gametas. Los estudios de inmunolocalización de CadE revelaron una señal específica en la región del capuchón acrosomal de espermatozoides humanos no capacitados y capacitados *in vitro*. Las evaluaciones empleando protocolos de incubación de espermatozoides con el primer anticuerpo previo a la fijación mostraron el mismo patrón de localización de CadE, resultados que sugieren la localización de CadE en la membrana plasmática del espermatozoide, y permiten proponer a esta molécula de adhesión como biomarcador de la integridad de la membrana plasmática del espermatozoide.⁹

Teniendo en cuenta estos antecedentes, desarrollamos un estudio con el objetivo de determinar:

- 1) El porcentaje de espermatozoides humanos móviles inmunoreactivos para CadE seleccionados a partir de muestras de semen de donantes normozoospermicos, recuperados del eyaculado fresco o previamente criopreservado, a fin de evaluar el efecto de la criopreservación del semen sobre la integridad de la membrana plasmática del espermatozoide.
- 2) El porcentaje de células inmunoreactivas para CadE en espermatozoides móviles recuperados del semen fresco o previamente congelado en pacientes en tratamiento por infertilidad, tratados con técnicas de Fecundación *In Vitro* (FIV) estándar o con Inyección intracitoplasmática del espermatozoide (ICSI; del inglés, *Intracytoplasmic Sperm Injection*).

Los estudios se realizaron sobre muestras de donantes normozoospermicos y de pacientes con anormalidades solo en la morfología o conjuntamente con alteraciones en la motilidad, así como en pacientes con parámetros seminales normales, en algunos casos diagnosticados con esterilidad sin causa aparente (ESCA). Para evaluar la expresión de CadE en espermatozoides de pacientes en tratamiento por infertilidad, se estableció una colaboración con el Instituto de Ginecología y Fertilidad (IFER, Ciudad Autónoma de Buenos Aires), para el desarrollo del proyecto de manera conjunta.

Materiales y metodos

Bioseguridad & bioética

Todos los procedimientos de laboratorio desarrollados en el curso del proyecto se realizaron siguiendo normas aceptadas de seguridad química y biológica.

Todas las muestras de semen humanas usadas en este proyecto se obtuvieron bajo consentimiento escrito de los donantes o pacientes; estos últimos, aceptaron donar el sobrante de muestras utilizadas para los procedimientos terapéuticos. Los protocolos fueron aprobados por el Comité de Ética de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica, del Instituto de Biología y Medicina Experimental y del Instituto de Ginecología y Fertilidad (Buenos Aires, Argentina).

Materiales

Reactivos

Todos los reactivos empleados a lo largo del estudio fueron obtenidos de la firma *Sigma Chemical Co* (St Louis, MO, EE.UU.), a menos que se indique.

Para la detección de CadE en los ensayos de inmunocitoquímica se empleó el anticuerpo policlonal H-108 dirigido contra un segmento proteico comprendido entre los aminoácidos 600-707 (dominio cadherina 5) (*Santa Cruz Biotech*, Santa Cruz, CA, EE.UU.) y anti-inmunoglobulina G (IgG) de conejo acoplada al colorante fluorescente CY3 (*Chemicon-Millipore*, Billerica, MA, EE.UU.) como segundo anticuerpo. Como control negativo del ensayo se empleó IgG normal purificada de conejo de origen comercial (Sigma).

Muestras de semen

Las muestras de semen humano provenientes de donantes normozoospermicos se evaluaron siguiendo los lineamientos de la Organización Mundial de la Salud (OMS).¹⁰ Las muestras se obtuvieron por masturbación luego de un período de abstinencia sexual de 2 a 4 días. El eyaculado fue mantenido a 37° C hasta completar la licuefacción. Solo se incluyeron en los estudios las muestras que presentaron más del 80% de los espermatozoides vivos en el eyaculado, 75% de motilidad progresiva y 14% de formas normales según el criterio estricto inicialmente descrito por el Dr T Kruger.¹¹ En algunos casos se hicieron también procedimientos de criopreservación con muestras de donantes normozoospermicos.

Además de las muestras de los donantes, se evaluaron muestras de semen de pacientes en tratamiento por infertilidad. En este caso se procesaron alícuotas del semen de pacientes en tratamiento con técnicas de FIV y/o ICSI. En algunos casos, las alícuotas de semen fueron previamente congeladas.

Métodos

Examen de rutina del semen

Todas las muestras de semen utilizadas en el presente estudio (donantes y pacientes en tratamiento por infertilidad) fueron sometidas a un examen de rutina siguiendo los lineamientos su-

geridos por el manual de la OMS.¹⁰ En todos los casos se realizaron determinaciones del volumen de la muestra, concentración, motilidad subjetiva y morfología espermática.

Criopreservación del semen

Para la criopreservación de las muestras de semen de donantes y de pacientes se tomó una alícuota de semen fresco (0,5-2,0 mL) y se diluyó con un volumen igual de buffer de criopreservación (*TEST Yolk Buffer*, *Irvine Scientific*, Sta Ana, CA, EE.UU.) y se dejó estabilizar por 10 minutos a temperatura ambiente en un criovial (*Cryovial*, *Simport Plastics*, Beloeil, Canadá); posteriormente se almacenó a 4° C por 30 minutos, seguido de tres descensos de 20 cm en vapores de nitrógeno de 10 minutos cada uno, para finalmente sumergirlo en nitrógeno líquido hasta el momento de su uso.

Para la recuperación de espermatozoides criopreservados, se tomó el criovial del termo de nitrógeno líquido y se lo colocó durante 2 minutos en agua a 35° C. Posteriormente, las muestras se procesaron para la obtención de la fracción mótil y para ensayos de inmunocitoquímica.

Selección de la fracción mótil

Una vez completadas las evaluaciones de rutina, las muestras de semen fueron procesadas para la obtención de la fracción mótil. Para ello, se emplearon diferentes procedimientos según el tipo de muestra de partida (semen fresco o congelado, proveniente de donantes o de pacientes):

- 1) Las muestras de semen fresco de donantes fueron procesadas empleando la técnica de filtración en columnas de lana de vidrio, utilizando medio HSM (*Human Sperm Medium*),¹² suplementado con albúmina sérica bovina (BSA; del inglés *Bovine Serum Albumin*) (0,3% p/v).
- 2) Las muestras de semen del eyaculado fresco de los pacientes tratados en el Instituto de Ginecología y Fertilidad (IFER) fueron sometidas a separación en gradientes de densidad *Pure Sperm*® (*Nidacon Int*, Mölndal, Suecia).
- 3) Las muestras provenientes de donantes y pacientes previamente congeladas fueron procesadas mediante la técnica de filtración de espermatozoides en columnas de lana de vidrio.

En todos los casos se evaluó la concentración, motilidad y vitalidad espermáticas luego del procedimiento de selección y se calculó el porcentaje de recuperación de espermatozoides móviles, de la siguiente manera:

% de recuperación = $(Vf \times Cf \times Mf / Vi \times Ci \times Mi) \times 100$, donde:

Vf y Vi: Volumen final e inicial.

Cf y Ci: Concentración final e inicial.

Mf y Mi: Motilidad final e inicial.

Capacitación espermática

En algunos casos, la fracción mótil de espermatozoides fue incubada en condiciones que promueven la capacitación espermática. Para ello, se incubaron las células en medio HSM suplementado con 2,6% p/v de BSA a 37° C en estufa gaseada (5% CO₂ en aire) a una concentración de 5×10^6 espermatozoides/mL por 18-20 horas.

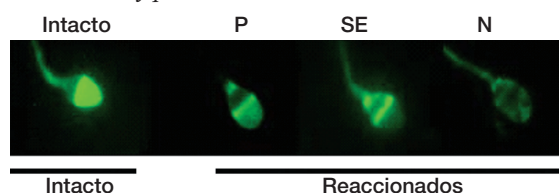
Inmunodetección de CadE en espermatozoides

Los espermatozoides previamente fijados fueron incubados por 18 horas a 4° C con el anticuerpo policlonal anti-CadE H-108. Luego de remover el anticuerpo no unido, las células se incubaron con segundo anticuerpo (anti-IgG de conejo acoplado a CY3) durante 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente se eliminó el anticuerpo no unido por sucesivos lavados con *PBS-Dulbecco* y las células se montaron en portaobjetos con cubreobjetos en presencia de solución de *Vectashield* (*Vector Lab Inc*, Burlingame, CA, EE.UU.). La localización de CadE fue analizada a una magnificación 1.000x utilizando un microscopio *Nikon* equipado para análisis de fluorescencia, con cámara acoplada a un programa de captura y procesamiento de imágenes (*IPLab, Scientific Image Processing*, Ver 3,06; *Scanalytic Inc*, EE.UU.). Los resultados se expresaron como valores promedio para cada patrón de localización de CadE de los registros obtenidos sobre por lo menos 200 células para cada individuo. En algunos casos se realizó el procedimiento estándar y un procedimiento adicional utilizando el primer anticuerpo a una concentración 10 veces menor.

Evaluación del estado del acrosoma

Para evaluar el estado del acrosoma de los espermatozoides, luego de ser fijados, fueron permeabilizados y teñidos con la lectina aglutinina de *Pisum sativum* (del nombre original *Pisum sativum* Agglutinin, PSA) marcada con isotiocianato de fluoresceína (FITC, del inglés *Fluorescein Isothiocyanate* (PSA-FITC) durante 1 hora a temperatura ambiente en oscuridad. Posteriormente, la lectina no unida fue eliminada por medio de lavados con *PBS-Dulbecco* y, finalmente, los preparados fueron montados con solución de *Vectashield* y analizados. Los espermatozoides se clasificaron como “intactos” (no reaccionados) cuando presentaron una tinción homogénea de gran intensidad sobre el acrosoma, mientras que se clasificaron como “reaccionados” (pérdida del contenido acrosomal) cuando solo se observó tinción en la región del segmento ecuatorial (SE), o en casos en los que se detectó pérdida parcial del contenido acrosomal (*patchy*, P) o no se observó señal de la lectina en la cabeza del espermatozoide (negativo, N) (Figura 1).

Figura 1. Patrones de tinción con PSA-FITC en espermatozoides humanos. Patrón Intacto: señal en el capuchón acrosomal; Patrones reaccionados: Patrón P o *patchy*: Señal punteada en el capuchón acrosomal; Patrón SE: Señal en el segmento ecuatorial; Patrón N: Negativo, con señal muy pobre o ausencia de señal.



Este procedimiento fue, además, realizado sobre las preparaciones de células luego de completado el protocolo de inmunodetección de CadE, de manera de determinar en forma simultánea el estado del acrosoma y la localización de CadE en cada espermatozoide. En todos los casos, se registraron, por lo menos, 200 células por cada condición analizada en cada individuo.

Resultados

Inmunodetección de CadE en espermatozoides provenientes de donantes normozoospermicos. Efecto de la criopreservación del semen

Se obtuvieron muestras de semen de 3 donantes normozoospermicos (D1, D2 y D3) y se analizaron los parámetros de rutina (volumen del eyaculado, concentración, cuenta y motilidad espermática), obteniéndose los resultados que se presentan a continuación:

Tabla 1. Resultado de la evaluación de los parámetros de rutina del semen: volumen del eyaculado (mL), concentración (millones de espermatozoides/mL), cuenta (millones de espermatozoides en el eyaculado) y motilidad (porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva) siguiendo los lineamientos de la Organización Mundial de la Salud (Manual OMS, Version IV, 1999).

Muestras	Volumen del semen	Concentración espermática	Cuenta espermática	Motilidad espermática
D1	5,5	149	820	67
D2	4,5	83	374	82
D3	3	60	180	82

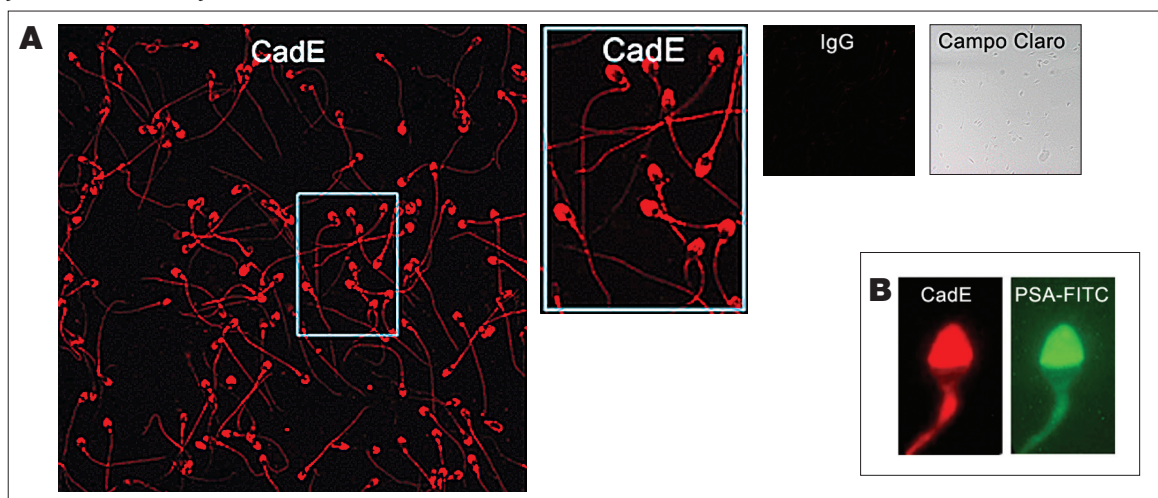
Una vez completada esa evaluación, se separó el semen en sendas alícuotas y una de ellas se sometió a criopreservación siguiendo el protocolo detallado en la Sección Materiales y Métodos. Se

procesaron la muestra criopreservada y sin criopreservar del mismo donante para seleccionar la fracción mótil. Esta técnica de separación de espermatozoides ha sido ampliamente utilizada en el laboratorio para recuperar espermatozoides móviles y fue elegida con el fin de obtener un alto número de células luego de la criopreservación. Como resultado de su uso se obtuvieron porcentajes de recuperación del 24 al 75% ($56 \pm 16\%$; promedio \pm error estándar del promedio, EEP) en espermatozoides previamente criopreservados.

En las tres muestras de espermatozoides frescos se detectaron altos porcentajes de espermatozoides con acrosomas intactos, obteniéndose un porcentaje de espermatozoides reaccionados promedio del $7 \pm 2\%$.

Los ensayos de inmunodetección de CadE, realizados de forma conjunta con la evaluación del estado del acrosoma, revelaron que el $90 \pm 1\%$ (promedio \pm EEP) de los espermatozoides frescos fueron inmunorreactivos para CadE en el capuchón acrosomal. Estos espermatozoides fueron clasificados como intactos luego de la tinción con la lectina PSA: (Figura 2).

Figura 2: A. Inmunodetección de CadE en espermatozoides móviles recuperados del eyaculado. En los ensayos de inmunofluorescencia indirecta estándar, los espermatozoides móviles seleccionados fueron incubados con el anticuerpo anti-CadE (H-108), seguido de lavados e incubaciones con segundo anticuerpo marcado con el fluorocromo CY3. Imágenes tomadas empleando microscopía láser confocal con objetivo PLAN APO 60x/1.4 oil. En el panel interno se muestra una sección ampliada en el panel superior de la derecha. En el panel derecho inferior se presenta el control negativo en donde el primer anticuerpo fue reemplazado por la IgG de conejo agregada a la misma concentración en la que se utilizó el primer anticuerpo (IgG) y la imagen correspondiente al campo claro. **B.** Detalle de la localización de CadE en espermatozoides humanos no capacitados. La imagen muestra el patrón mayoritario de localización para espermatozoides de tinción en el capuchón acrosomal. Se observó, además, señal para CadE en el flagelo. Imágenes tomadas en microscopio óptico de fluorescencia con objetivo 100x. Derecha: Tinción con la lectina PSA-FITC.



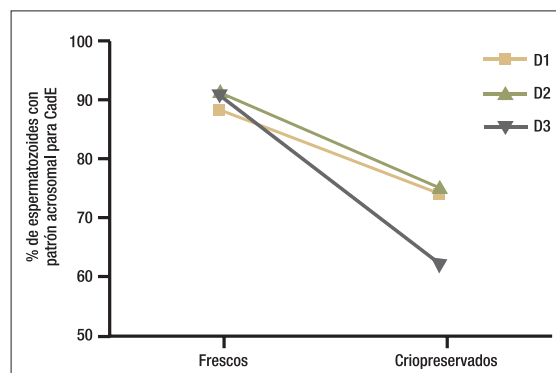
En las muestras criopreservadas provenientes de los 3 donantes se registró un incremento en el porcentaje de espermatozoides reaccionados, que alcanzó valores promedio del $16 \pm 1\%$, similares a los registrados para espermatozoides del eyaculado seleccionados e incubados en condiciones que promueven la capacitación ($15 \pm 3\%$). Estas observaciones son consistentes con datos previos de la literatura, en donde se menciona que en modelos animales la criopreservación de los espermatozoides induce un estado de “pre-capacitación”.¹³ En un ensayo preliminar se utilizaron muestras criopreservadas de donantes normales para evaluar el estado de capacitación mediante el uso de un inductor fisiológico de la exocitosis acrosomal, como es el fluido folicular humano. Los resultados mostraron que los espermatozoides criopreservados respondían al inductor a tiempos más cortos que los espermatozoides no criopreservados (datos no mostrados).

En muestras criopreservadas, los estudios de inmunodetección de CadE mostraron que el $70 \pm 4\%$ (promedio \pm EEP) de los espermatozoides fueron inmunorreactivos en el capuchón acrosomal. Este valor fue significativamente ($P < 0,05$) menor al determinado para las muestras de los mismos donantes sin criopreservar. La disminución observada no fue el resultado de alteraciones identificables en el comportamiento de la muestra de un individuo en particular, sino que esta tendencia fue observada en los tres casos (Tabla 2 y Figura 3).

Tabla 2. Resultado de la inmunodetección de CadE (patrón acrosomal) en alícuotas de muestras de tres donantes (D1, D2 y D3) procesados inmediatamente luego de su obtención (espermatozoides frescos) o sometidos a protocolo de criopreservación. * $P < 0,05$ Prueba t de Student.

Muestras	CadE patrón acrosomal en espermatozoides frescos (%)	CadE patrón acrosomal en espermatozoides post-criopreservación (%)
D1	89	62*
D2	92	75
D3	91	74

Figura 3. Representación gráfica del porcentaje de espermatozoides con patrón acrosomal para CadE en suspensiones de espermatozoides móviles recuperados de muestras de semen fresco (Frescos) y previamente sometidos a un protocolo de criopreservación (Criopreservados). Se muestran los resultados obtenidos para tres donantes (D1, D2 y D3).



En resumen, como resultado de la criopreservación, se observó una disminución en el porcentaje de espermatozoides inmunorreactivos para CadE en la región acrosomal. Estos resultados concuerdan con estudios reportados por otros autores que describen alteraciones en los niveles de proteínas espermáticas en muestras previamente criopreservadas, causadas por el *shock* térmico, que induce la pérdida de componentes de la membrana espermática.^{14,15} Los cambios en los niveles de CadE observados fueron más dramáticos que otros, tales como el porcentaje de espermatozoides móviles en cada muestra (datos no mostrados). Estos resultados concuerdan con reportes previos de la literatura que describen que los resultados de la evaluación de la motilidad espermática y la capacidad fecundante de los espermatozoides no correlacionan, evidenciando la presencia de daños subletales como consecuencia de la criopreservación, que ocurren a diferentes niveles dentro de cada espermatozoide.¹⁶

Evaluación de la expresión de CadE en muestras de semen de pacientes en tratamiento por infertilidad

Estudios con espermatozoides seleccionados a partir de semen fresco

Se evaluó la presencia y localización de señal para CadE en espermatozoides del semen de un total de 21 pacientes en tratamiento por infer-

tilidad, tratados con procedimientos de FIV o ICSI. En todos los casos se completó el análisis de rutina del semen y se establecieron como criterios de normalidad la presencia de una concentración espermática de al menos 10 millones/mL, un porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva de al menos 45% y un porcentaje de espermatozoides con morfología normal de al menos 12%. Estos valores varían respecto de los establecidos por la Organización Mundial de la Salud (Manual OMS versión IV, año 1999), dado que fueron adaptados por el centro de fertilidad como estándares en muestras empleadas en procedimientos de reproducción asistida de alta complejidad como son la FIV y el ICSI. En estas muestras, el procedimiento de selección de espermatozoides móviles empleado fue un gradiente de densidad (*Pure Sperm*[®]). Los espermatozoides móviles recuperados se fijaron y se tiñeron con anticuerpo anti-CadE y segundo anticuerpo acoplado a CY3, se montaron y analizaron.

Del total de los 21 pacientes evaluados, se identificaron 8 casos en los que el semen presentó parámetros de concentración y motilidad dentro de los rangos de normalidad considerados (concentración: >10 millones/mL; motilidad >45% espermatozoides con motilidad progresiva) y con un porcentaje de formas normales igual o superior a 12% (muestras normales o con buen pronóstico de FIV), los cuales fueron tratados con FIV (Pacientes P-FIV#; Tabla 3). Los pacientes restantes presentaron, además de un porcentaje de formas normales menor al 12%, alteraciones en el porcentaje de espermatozoides móviles (<45%) y fueron tratados con ICSI (P-ICSI#; Tabla 4).

En el grupo de los pacientes con parámetros seminales normales y tratados con FIV, 7 de las 8 muestras presentaron altos porcentajes de células con señal para CadE en el capuchón acrosomal (91-97%). Los valores obtenidos fueron similares a los registrados en las muestras de los donantes normozoospermicos evaluados en paralelo ($90 \pm 1\%$ de espermatozoides con localización de CadE en la región acrosomal; promedio \pm EEP). Sin embargo, en el caso de *P-FIV17*, el porcentaje de espermatozoides inmunorreactivos para CadE en el acrosoma fue del 40%, valor francamente disminuido respecto del determinado en los donan-

Tabla 3. Evaluación de las características seminales y localización de CadE de la población de pacientes en tratamiento por infertilidad con procedimientos de FIV. La tabla muestra los valores de concentración (millones/mL), motilidad (% de espermatozoides con motilidad progresiva) y morfología (% de formas normales; criterio estricto de Kruger) espermática, así como también los porcentajes de espermatozoides con localización de CadE en la región acrosomal (protocolo estándar). En todos los casos para cada individuo se analizaron al menos 200 células para cada parámetro.

Muestras	Concentración	Motilidad	Morfología	CadE patrón acrosomal
P-FIV2	45	55	12	97
P-FIV4	70	56	12	96
P-FIV5	46	46	12	96
P-FIV13	100	65	12	95
P-FIV1	160	65	13	97
P-FIV14	70	53	13	92
P-FIV3	100	60	14	91
P-FIV17	200	65	14	40

Tabla 4. Evaluación de las características seminales y localización de CadE de la población de pacientes en tratamiento por infertilidad con procedimientos de ICSI. La tabla muestra los valores de concentración (millones/mL), motilidad (% de espermatozoides con motilidad progresiva) y morfología espermática (% de formas normales; criterio estricto de Kruger), así como también los porcentajes de espermatozoides con localización de CadE en la región acrosomal (protocolo estándar). En todos los casos para cada individuo se analizaron al menos 200 células para cada parámetro.

Muestras	Concentración	Motilidad	Morfología	CadE patrón acrosomal
P-ICSI18	80	62	4	90
P-ICSI16	46	55	4	25
P-ICSI10	10	48	5	84
P-ICSI20	12	33	6	86
P-ICSI12	42	29	6	96
P-ICSI9	25	45	6	96
P-ICSI8	30	42	7	94
P-ICSI7	40	35	8	89
P-ICSI21	10	22	9	72
P-ICSI19	50	60	9	82
P-ICSI15	120	70	9	97
P-ICSI6	70	40	10	90
P-ICSI11	70	40	10	93

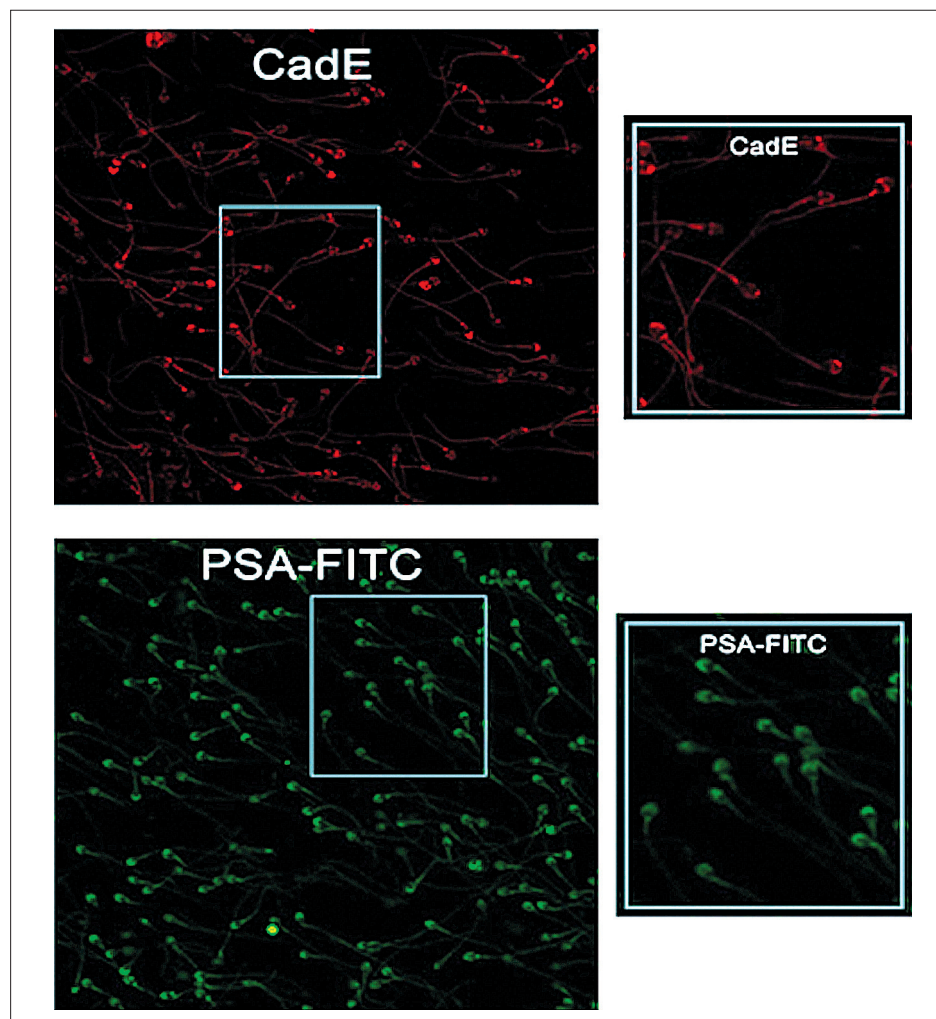
tes. Esta muestra de semen presentó parámetros de rutina del semen dentro de los valores normales (concentración espermática: 200 millones/mL; motilidad: 65% espermatozoides progresivos;

morfología: 14% formas normales). En la misma muestra se evaluó el estado acrosomal mediante la tinción con PSA-FITC, obteniéndose un porcentaje de espermatozoides con acrosomas intactos de 78%, resultado similar a los valores obtenidos para poblaciones de espermatozoides no capacitados recuperados del semen ($85 \pm 5\%$; rango 70-93%; promedio \pm EEP) (Figura 4). Cabe destacar que el paciente fue sometido a un procedimiento de FIV estándar, en el que la tasa

de fecundación obtenida fue del 80% (8 ovocitos fecundados/10 ovocitos inseminados), valor considerado en el límite de normalidad para el procedimiento de FIV estándar por el Instituto de Ginecología y Fertilidad. En el resto de los pacientes tratados con FIV, las tasas de fecundación fueron entre el 88 y 100% (datos no mostrados).

En el grupo de los 13 pacientes que presentaron porcentajes de espermatozoides con formas

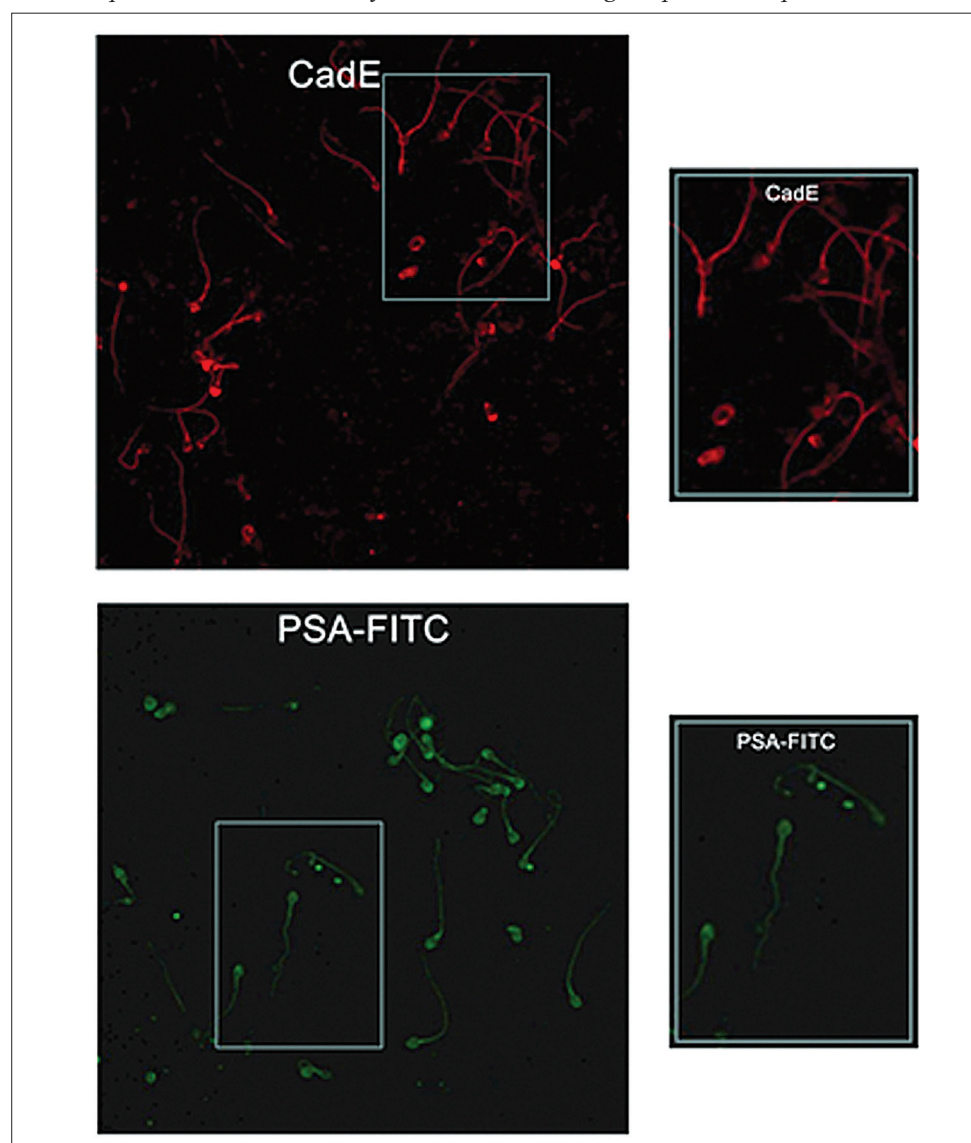
Figura 4. Inmunodetección de CadE en espermatozoides móviles recuperados del eyaculado del paciente P-FIV17. En los ensayos de inmunofluorescencia indirecta, los espermatozoides móviles seleccionados fueron incubados con el anticuerpo anti-CadE (H-108), seguido de lavados e incubaciones con segundo anticuerpo marcado con el fluorocromo CY3 (protocolo estándar). Imágenes tomadas empleando microscopía láser confocal con objetivo PLAN APO 60x/1.4 oil. En el panel interno se muestra una sección ampliada en el panel a la derecha. En el panel inferior se presenta la imagen de la tinción para la lectina PSA-FITC y la sección marcada luego ampliada en el panel a la derecha.



normales menores al 12%, se encontraron, además, 7 casos con porcentajes anormales de motilidad progresiva espermática (22-40%). Respecto de *P-ICSI16*, el bajo porcentaje de células clasificadas con morfología normal (4%) fue acompañado por un porcentaje bajo de células inmunorreactivas para CadE (25%). La evaluación del

estado del acrosoma en este paciente arrojó un valor del 64% de células con sus acrosomas intactos y un bajo porcentaje de células negativas para la tinción con la lectina (28%); mientras que el donante normal presenta un $85 \pm 5\%$ (rango 70-93%; promedio \pm EEP) de espermatozoides con sus acrosomas intactos (Figura 5).

Figura 5. Inmunodetección de CadE en espermatozoides móviles recuperados del eyaculado del paciente *P-ICSI16*. En los ensayos de inmunofluorescencia indirecta, los espermatozoides móviles seleccionados fueron incubados con el anticuerpo anti-CadE (H-108), seguido de lavados e incubaciones con segundo anticuerpo marcado con el fluorocromo CY3 (protocolo estándar). Imágenes tomadas empleando microscopía láser confocal con objetivo PLAN APO 60 \times /1.4 oil. En el panel interno se muestra una sección ampliada en el panel a la derecha. En el panel inferior se presenta la imagen de la tinción para la lectina PSA-FITC y la sección marcada luego ampliada en el panel a la derecha.



Cuando se realizó la inmunolocalización de CadE con anticuerpo anti- CadE a una concentración diez veces menor que la utilizada en los protocolos estándar, el porcentaje de células con localización de la proteína en el acrosoma disminuyó aún más, determinándose solo en el 1% de las células. La tasa de fecundación por ICSI obtenida para este paciente fue del 100% (3 ovocitos fecundados / 3 ovocitos inyectados), confirmando que esta técnica de alta complejidad, que permite sobrellevar las barreras biológicas naturales para el espermatozoide con funcionalidad disminuida, es la opción terapéutica adecuada en este caso.

En el mismo grupo se identificó el paciente *P-ICSI21*, con una motilidad alterada y un porcentaje de células con morfología normal en el límite inferior de la normalidad (9%). En este caso, el porcentaje de células positivas para CadE en el acrosoma fue del 72%, un valor menor (20%) al observado en el grupo de pacientes normales ($90 \pm 1\%$). Cuando se realizó la tinción a la menor concentración del anticuerpo anti-CadE nuevamente se observó que el porcentaje de células con localización de CadE en acrosoma fue menor que el encontrado en los espermatozoides control (*P-ICSI21*: 76% versus control $88 \pm 3\%$). En el procedimiento de ICSI se obtuvo una tasa de fecundación del 83%. Debe destacarse que esta pareja presentaba varias fallas previas en tratamientos anteriores y presentó un embarazo no evolutivo en el ciclo en que fue analizada la muestra de espermatozoides.

Estudios con espermatozoides seleccionados a partir de semen previamente criopreservado

Se procedió a realizar el análisis de la presencia y localización de CadE en individuos con Esterilidad Sin Causa Aparente (ESCA). Dada la baja incidencia de pacientes con este diagnóstico, estimados entre el 10 y el 15% de las parejas en consulta por infertilidad,¹⁷ se decidió almacenar las muestras hasta tener un número mínimo aceptable como para su procesamiento en un lapso de tiempo corto y así eliminar variables adicionales derivadas de la metodología de evaluación (por ejemplo, lotes de medio de cultivo, de suplemen-

tos proteicos, anticuerpos para la detección de la proteína, entre otros).

De esta manera se incluyeron en este grupo estudiado 10 muestras con diagnóstico ESCA (*P-ESCA#*) y 6 pacientes sin alteraciones en los parámetros seminales de rutina, en los que se identificó causa de infertilidad femenina (*P-N#*). En ambos grupos, todas las muestras de semen presentaron parámetros de rutina dentro de los valores normales (criterio OMS, 1999). Para la criopreservación se utilizó el mismo protocolo que el empleado para los donantes (ver detalles en la sección de Materiales y Métodos). Las muestras fueron descongeladas y procesadas para la inmunodetección de CadE.

Los resultados obtenidos se presentan en las Tablas 5 y 6.

Tabla 5. Características seminales de las muestras de semen criopreservadas de la población de pacientes con parámetros seminales dentro de los valores normales e infertilidad clínica identificada en la pareja. La tabla muestra los valores de concentración (millones/mL), motilidad (% espermatozoides móviles) y morfología (% formas espermáticas normales según criterio estricto de Kruger) de la muestra y los porcentajes de espermatozoides con localización de CadE en el acrosoma luego de realizar el ensayo de inmunocitoquímica (protocolo estándar). En todos los casos para cada individuo se analizaron al menos 200 células.

Muestras	Concentración	Motilidad	Morfología	CadE patrón acrosomal
P-N1	86	55	9	77
P-N10	26	56	8	74
P-N12	60	65	7	52
P-N13	200	72	12	76
P-N15	221	63	10	63
P-N16	104	72	12	75

Según se desprende de los resultados, en la mayor parte de los casos los porcentajes de espermatozoides con patrón de localización de CadE en el capuchón acrosomal fueron similares a los obtenidos en las muestras de donantes previamente criopreservadas (promedio: $70 \pm 4\%$; rango: 62-75%) e inferiores a los observados en espermatozoides procesados sin criopreservar (*P-N#* rango: 52-77%; *P-ESCA*s rango: 61-90%). La presencia de valores menores a los registrados en muestras sin previa criopreservación permite

Tabla 6. Características seminales de las muestras de semen criopreservadas de la población de pacientes con semen con parámetros dentro de los valores normales, clasificados con esterilidad sin causa aparente (ESCA). La tabla muestra los valores de concentración (millones/mL), motilidad (% espermatozoides móviles) y morfología (% formas espermáticas normales según criterio estricto de Kruger) de la muestra y los porcentajes de espermatozoides con localización de CadE en el acrosoma luego de realizar el ensayo de inmunocitoquímica (protocolo estándar). En todos los casos para cada individuo se analizaron al menos 200 células.

Muestras	Concentración	Motilidad	Morfología	CadE patrón acrosomal
P-ESCA2	30	55	9	74
P-ESCA3	93	51	9	88
P-ESCA4	70	55	7	61
P-ESCA5	141	57	9	66
P-ESCA6	57	52	11	84
P-ESCA7	76	53	10	62
P-ESCA9	43	53	11	69
P-ESCA11	120	75	12	87
P-ESCA14	130	74	11	64
P-ESCA17	90	76	13	90

especular sobre la presencia de alteraciones causadas en la membrana plasmática de la gameta por el proceso de criopreservación, que se reflejarían en una disminución en la señal de CadE.

En la población de los pacientes con parámetros seminales normales se identificó un caso, P-N12, en el que se registró un porcentaje de células inmunorreactivas para CadE en el acrosoma del 52%, valor menor respecto al promedio determinado para las muestras criopreservadas de los donantes ($70 \pm 4\%$). La inmunodetección realizada con el anticuerpo anti-CadE a la menor concentración reveló un porcentaje de espermatozoides con localización de CadE en acrosoma del 32%. Contrastando con este resultado, el porcentaje de espermatozoides inmunorreactivos para CadE en los controles no se modificó sustancialmente a menor concentración de anticuerpo (control anti-CadE a $2 \mu\text{g/mL}$: $69 \pm 15\%$; $n = 3$ donantes). En este caso el procedimiento de FIV sobre espermatozoides móviles seleccionados a partir del eyaculado de P-N12 sin previa criopreservación resultó en una tasa de fecundación del 100% (6 ovocitos fecundados / 6 ovocitos totales), resultados que sugerirían alteraciones en la muestra durante el proceso de criopreservación.

Desafortunadamente no se contó con una alícuota de la muestra del paciente previo a la criopreservación para análisis por inmunocitoquímica.

Cuando se examinaron los resultados correspondientes al grupo de los pacientes ESCA, se identificó un caso, el paciente P-ESCA4, que mostró un porcentaje de espermatozoides inmunorreactivos para CadE en la región acrosomal del 61%. Cuando esa evaluación se repitió con el anticuerpo a la menor concentración, solo se encontraron 36% de células teñidas para CadE en el acrosoma; como se mencionara anteriormente, esta disminución no fue observada en los donantes. En el resto de los casos ESCA evaluados no se observó una caída tan importante en el porcentaje de células teñidas para CadE cuando las células se tiñeron con el anticuerpo a la concentración menor (P-ESCA2: 72%; P-ESCA3: 78%; P-ESCA6: 56%; P-ESCA9: 63%, P-ESCA11: 89%; P-ESCA14: 63%; P-ESCA17: 89%). En este punto debe destacarse que en el procedimiento de reproducción asistida realizado con el paciente ESCA4, se determinó una tasa de fecundación del 45% (5 ovocitos fecundados / 11 ovocitos totales) en FIV estándar, valor considerado por debajo de lo normal (tasa de fecundación normal $> 80\%$).

Conclusiones

Los resultados del presente estudio describen la detección de una disminución significativa en los porcentajes de espermatozoides inmunorreactivos para CadE en espermatozoides seleccionados de muestras de semen de donantes normozoospermicos previamente criopreservadas, respecto de alícuotas frescas de las mismas muestras procesadas siguiendo el mismo protocolo. Estos resultados permiten proponer a la proteína CadE como un marcador de integridad de la membrana del espermatozoide humano. Asimismo, los estudios de inmunodetección de CadE realizados sobre muestras de espermatozoides móviles recuperados de semen fresco o previamente criopreservado de pacientes en tratamiento por infertilidad, permitieron identificar casos con alteraciones en los niveles de CadE, asociados a un desempeño alte-

rado en procedimientos de reproducción asistida (FIV e ICSI). Estudios sobre un número mayor de pacientes permitirán evaluar la contribución del análisis de la presencia de CadE al diagnóstico de la infertilidad masculina, en particular, el aporte de una posible sub-clasificación de las muestras de los pacientes en función de los porcentajes de células inmunorreactivas para CadE.

Los resultados presentados, en conjunto con las evidencias previamente reportadas por el equipo de investigación, permiten proponer a CadE como un biomarcador estructural y funcional del espermatozoide humano.

Financiamiento: Los estudios presentados fueron financiados con fondos de subsidios del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas de Argentina (CONICET) (PIP# 5352 y 2120) a Mónica Hebe Vázquez-Levin.

Agradecimientos: Agradecemos a todos los profesionales del IFER y del grupo del IBYME por la colaboración en el desarrollo del proyecto. Los Dres Mónica Hebe Vázquez-Levin y Clara Marín-Briggiler son miembros de la Carrera del Investigador Científico del CONICET. Los trabajos desarrollados por María Florencia Veiga fueron realizados en el marco de su beca de Postgrado Doctoral de CONICET.

Referencias

1. World Health Organization: Report of the meeting on the prevention of infertility at the primary health care level. 1984. WHO, Geneva 1983, WHO/ MCH.
2. Quinn PJ. Effects of temperature on cell membranes. Symp Soc Exp Biol 1988; 42: 237-258.
3. Holt WV & North RD. Cryopreservation, actin localization and thermotropic phase transitions in ram spermatozoa. J Reprod Fertil 1991; 91: 451-461.
4. Mazzilli F, Rossi T, Sabatini L, y col. Human sperm cryopreservation and reactive oxygen species (ROS) production. Acta Eur Fertil 1995; 26: 145-148.
5. Chatterjee S & Gagnon C. Production of reactive oxygen species by spermatozoa undergoing cooling, freezing, and thawing. Mol Reprod Dev 2001; 59: 451-458.
6. Chohan KR, Griffin JT, Carrell DT . Evaluation of chromatin integrity in human sperm using acridine orange staining with different fixatives and after cryopreservation. Andrologia 2004; 36: 321-326.
7. Angst BD, Marozzi C, Magee AL. The cadherin superfamily. J Cell Sci 2001; 114: 625-626.
8. van Roy E & Berx G. The cell-cell adhesion molecule E-cadherin. Cell Mol Life Sci 2008; 65: 3756-3788.
9. Marín-Briggiler CI, Veiga MF, Matos ML, y col. Expression of epithelial cadherin in the human male reproductive tract and gametes and evidence of its participation in fertilization. Mol Hum Reprod 2008; 14: 561-571.
10. World Health Organization. "WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction". Cambridge University Press, Cambridge, UK, 1999.
11. Kruger TF, Menkveld R, Stander FSH, y col. Sperm morphologic features as a prognostic factor in in vitro fertilization. Fertil Steril 1986; 46: 1118-1123.
12. Suarez SS, Wolf DP, Meizel S. Induction of the acrosome reaction in human spermatozoa by a fraction of human follicular fluid. Gam Res 1986; 14:107-121.
13. Cormier N & Bailey JL. A differential mechanism is involved during heparin and cryopreservation-induced capacitation of bovine spermatozoa. Biol Reprod 2003; 69: 177-185.
14. Lasso JL, Noiles EE, Alvarez JG, y col. Mechanism of superoxide dismutase loss from human sperm cells during cryopreservation. J Androl 1994; 15: 255-265.
15. Desrosiers P, Légaré C, Leclerc P, y col. Membranous and structural damage that occur during cryopreservation of human sperm may be time-related events. Fertil Steril 2006; 85(6):1744-1752.
16. Watson PF. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. Reprod Fertil 1995; Dev 7:871-891.
17. Bouvet BR, Brufman AS, Paparella CV. Macrófagos en semen humano. Ach Esp Urol 2003; 56:983-987.



fertilab

MEDICINA REPRODUCTIVA

HACEMOS LO IMPOSIBLE POR HACERLO POSIBLE

**Fertilab es una organización abierta a la comunidad médica y científica,
que da respuesta a sus necesidades:**

- Laboratorio de Reproducción Asistida de Baja y Alta complejidad
 - Andrología
 - Endocrinología
 - Ovodonación
 - Consulte por otros procedimientos

Más de 25 años de trayectoria e innovación en técnicas de reproducción asistida
con responsabilidad, calidad humana y excelentes resultados.

Riobamba 1205 P1 4811-7575
www.fertilab.com.ar

